



Ministero delle Attività Produttive
Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività
Ufficio Italiano Brevetti e Marchi
Ufficio G2

REC'D 13 JUL 2004
WIPO PCT

Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per:

N. MI2003 A 000778

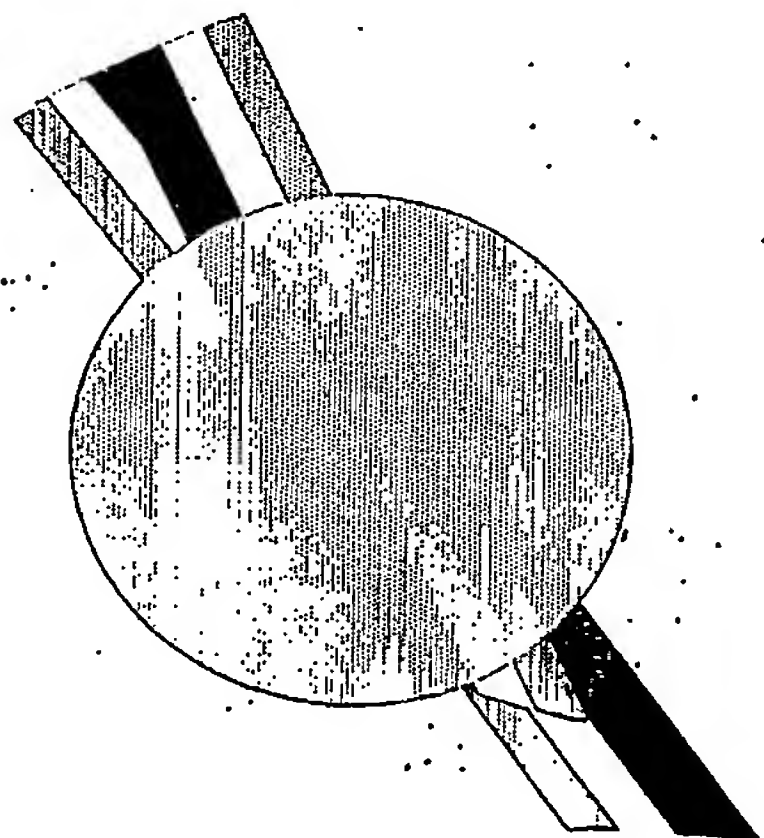
Invenzione Industriale



*Si dichiara che l'unita copia è conforme ai documenti originali
depositati con la domanda di brevetto sopraspecificata, i cui dati
risultano dall'accluso processo verbale di deposito.*

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Roma, li 18 FEB. 2004



IL DIRIGENTE

P. Galloppo
Dr. Paolo GALLOPPO

RIASSUNTO INVENZIONE, CON DISEGNO PRINCIPALE, DESCRIZIONE E RIVENDICAZIONE

NUMERO DOMANDA

M12003A000778 REG. A

DATA DI DEPOSITO

15/04/2003

NUMERO BREVETTO

DATA DI RILASCIO

/ / /

D. TITOLO

"Procedimento per la preparazione enzimatica dell'aroma di vaniglia"

L. RIASSUNTO

La presente invenzione ha per oggetto un procedimento per la preparazione di un estratto di vaniglia, procedimento che consiste nel sottoporre le bacche verdi di vaniglia a imbrunimento accelerato seguito da un trattamento estrattivo/enzimatico.

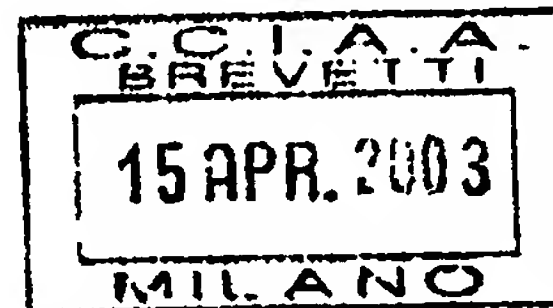
M. DISEGNO



97 M Descrizione del brevetto per invenzione industriale avente per titolo:
aB/mc **"PROCEDIMENTO PER LA PREPARAZIONE ENZIMATICA
DELL'AROMA DI VANIGLIA"**

a nome : **INDENA S.p.A.**

con sede in: **Milano**



* * *

MI 2003 A 0 0 0 7 7 8

La presente invenzione ha per oggetto un nuovo procedimento per la preparazione dell'aroma di vaniglia.

L'aroma di vaniglia è la risultante di una miscela bilanciata di sostanze organiche, contenute nel baccello di un'orchidea, *Vanilla planifolia*.

In particolare il composto principale, la vanillina, si forma a partire dal suo precursore glucosilato (glucovanillina) durante la maturazione delle bacche, per idrolisi enzimatica naturale a opera degli enzimi presenti nel frutto.

I procedimenti tradizionali per l'estrazione della vanillina prevedono pertanto un periodo di maturazione, che richiede tempi prolungati (da uno a cinque mesi, a seconda del luogo di raccolta), numerosi controlli di qualità protratti nel tempo e risente fortemente dell'influenza delle condizioni ambientali. Questo di conseguenza, comporta una variabilità marcata del prodotto finale ed una parziale perdita del contenuto in vanillina. Pertanto tale procedimento è molto costoso dal punto di vista industriale.

EP 0 555 466 descrive un procedimento alternativo alla maturazione naturale, che consiste nel trattamento delle bacche verdi, opportunamente macinate, con enzimi idrolasici (cellulasi, pectinasi, β -glucosidasi) che svolgono la duplice funzione di lisare i tessuti vegetali del frutto, facilitando l'estrazione del principio attivo preesistente, e contemporaneamente di

idrolizzare la glucovanillina liberata in vanillina.

La presente invenzione ha per oggetto un procedimento per la preparazione di un estratto di vaniglia, procedimento che consiste nel sottoporre le bacche verdi di vaniglia a un trattamento combinato di estrazione e di successiva lisi enzimatica dell'estratto ottenuto con un sistema enzimatico ad elevata attività litica globale.

Secondo l'invenzione, il procedimento è svincolato dalle pesanti limitazioni temporali (incubazione di mesi) ed ambientali dei processi industriali attualmente noti, e nello stesso tempo garantisce, con alte rese, un prodotto arricchito in vanillina. Il procedimento dell'invenzione comporta pertanto notevoli vantaggi in termini di semplicità, brevità, riproducibilità e rese rispetto ai procedimenti noti.

Il procedimento oggetto della presente invenzione comprende le seguenti fasi:

- a) imbrunimento accelerato delle bacche;
- b) estrazione delle bacche imbrunite seguita da trattamento con sistema enzimatico ad attività cellulasica e emicellulasica;
- c) purificazione dei prodotti fino ad un concentrato arricchito in vanillina.

L'imbrunimento accelerato delle bacche, fase a), consiste nel congelamento delle bacche verdi a temperature comprese tra -10 e -30°C e nel successivo scongelamento a temperatura compresa tra 2 e 8°C preferibilmente a 4°C, in assenza di luce, per il periodo di tempo necessario a raggiungere la temperatura desiderata generalmente compreso tra 0,5 e 7 giorni.

L'estrazione viene effettuata direttamente sulle bacche imbrunite, previamente macinate, con soluzioni idroetanoliche di concentrazione variabile da 20 a 80% v/v, preferibilmente tra 40 e 60% v/v a temperature comprese tra 40°C e 80°C, preferibilmente tra 60°C e 70°C, con tempi di contatto tra 70 e 100 minuti.

L'estratto ottenuto viene quindi concentrato per evaporazione fino a un residuo secco da circa 35 a circa 25% p/p. Il concentrato viene poi diluito con acqua fino a un residuo secco variabile dal 5 al 20% p/p e sottoposto al trattamento enzimatico.

Il sistema enzimatico impiegato secondo l'invenzione, è caratterizzato da spiccata attività cellulasica compresa tra 2000 e 6000 UI/g, preferibilmente tra 3000 e 5000 UI/g ed ancor più preferibilmente, dotato di attività cellulasica pari a 4000 UI/g. Questo sistema enzimatico si differenzia dagli enzimi citati nella "prior art" (spesso utilizzati in miscele anche complesse di più tipi diversi), per la sua più elevata attività litica globale, che ne permette l'impiego in concentrazioni anche molto limitate, anche dello 0,1 - 0,3% sulla bacca fresca, o inferiori. Questo fattore si risolve in un indubbio vantaggio, non solo in termini di fattibilità industriale e di economicità, ma anche di riproducibilità del prodotto ottenuto.

La lisi enzimatica, che ha lo scopo di liberare la vanillina, può essere condotta in ambiente non sterile, in tank dotato di agitatore (ad es. agitatore ad ancora), con agitazione continua non elevata oppure in statico, oppure con agitazione ad intermittenza. Il tank deve essere dotato di termostatazione; la reazione è condotta a temperature comprese tra 25°C e 45°C, preferibilmente tra 30°C e 40°C, per un tempo compreso tra 20 e 72 ore, preferibilmente tra 24 e 40 ore. Viene aggiunta una quantità di enzima con attività cellulasica di 2000-6000 UI/g, pari allo 0,05÷0,4% sulla droga fresca, preferibilmente allo 0,1÷0,3%, solubilizzata sotto agitazione lenta in un volume d'acqua all'incirca pari al quantitativo di bacche macinate. Il pH della miscela può variare tra 3,5 e 5,5, preferibilmente tra 4 e 5. La trasformazione può essere seguita mediante controllo in TLC od HPLC e viene condotta fino a quando si rivela un apprezzabile aumento dei componenti desiderati.

La purificazione (fase b) prevede infine una serie di trattamenti con soluzioni idroetanoliche a diverso grado alcolico per la depurazione del molle acquoso, o di una soluzione idroalcolica al 50% v/v in etanolo, ottenuta per diluizione con etanolo dell'estratto trattato enzimaticamente, operando a temperature comprese tra 40°C e 50°C. Le frazioni idroetanoliche ottenute sono riunite e concentrate sotto vuoto, a temperature non superiori a +45°C, fino ad ottenere un concentrato denso acquoso.

Il prodotto così ottenuto può essere ulteriormente purificato con piccoli volumi di etanolo concentrato, ai fini di una maggiore purezza del materiale.

Possono essere effettuati ulteriori interventi di purificazione, per esempio estrazioni con acetato di etile e sostituzioni con miscele alcoliche, per avere prodotti più concentrati e purificati.

L'analisi delle fasi intermedie e del prodotto finale può essere effettuata mediante TLC ed HPLC.

Per l'analisi TLC si utilizzano convenientemente lastre Silica Gel 60F254 (Merck), Sistema eluente: Cloroformio - Metanolo, 85:15; rivelazione in UV a 254 nm; successiva reazione con reattivo CAS (Cerio ammonio solfato biidrato, ammonio molibdato tetraidrato, acido solforico concentrato) ed esame delle bande nel visibile.

L'analisi HPLC può essere convenientemente effettuata su colonne Zorbax Eclipse XDB-C18 ® (250 X 4.6 mm) 5 µm, in gradiente lineare di H₃PO₄ 0,3%/acetonitrile 95:5-10:90, flusso 1 ml/min., λ 254 nm, tempo di corsa 55 min.

Il prodotto finale ottenibile secondo il procedimento della presente invenzione ha un contenuto in vanillina pari a 4,2 - 8,5g per Kg di bacche verdi di partenza e caratteristiche organolettiche superiori ai prodotti ottenibili con i metodi della prior-art.



Il procedimento dell'invenzione è illustrato in maggior dettaglio nei seguenti esempi.

ESEMPIO 1

1). Estrazione

Le bacche verdi, congelate a -20°C e riportate a temperatura di 4°C (bacche imbrunite; 139 Kg, con titoli 1,19% p/p in Vanillina Glucoside e 0,10% p/p in Vanillina) sono passate in tritacarne con griglia da 4,5 mm e caricate in percolatore.

La droga macinata è estratta fino ad esaurimento con etanolo 50% v/v. Per la prima estrazione la quantità di etanolo 95% v/v aggiunta è calcolata in base al contenuto d'acqua delle bacche (ca. 80% p/p) in modo di ottenere una soluzione al grado alcolico 50% v/v (ovvero 124 litri). Per le successive estrazioni (8 in totale) si utilizza un volume (espresso in litri) di etanolo 50% v/v pari al peso (espresso in Kg) della droga macinata (ovvero 139 litri). Ciascuna estrazione è condotta alla temperatura $+70^{\circ}\text{C}$ e con tempo di contatto 90 minuti.

I percolati idroalcolici ottenuti sono riuniti e concentrati sottovuoto a $+30^{\circ}\text{C}$, fino ad ottenere un molle denso (36 Kg, residuo secco del 27% p/p) che viene stabilizzato mediante l'aggiunta di etanolo per ottenere un grado alcolico del 20% v/v (% calcolato sull'acqua presente) e conservato a $+4^{\circ}\text{C}$ fino all'utilizzo per la bioconversione.

2) Trasformazione enzimatica

Prima della biotrasformazione l'etanolo presente è allontanato dal concentrato intermedio mediante due sostituzioni con acqua.

Il concentrato ottenuto è diluito con acqua sino all'ottenimento di una soluzione al 10% p/p di residuo secco. Alla soluzione è addizionato l'enzima Cellulosin AC40, in ragione di ca. 0,2% p/p della droga macinata.

La biotrasformazione (95 litri di miscela di reazione in reattore da 250 litri nominali) viene condotta a $+40^{\circ}\text{C}$ per 48 ore sotto blanda agitazione.

A fine trasformazione la sospensione viene concentrata sotto vuoto a $+30^{\circ}\text{C}$ e stabilizzata con l'aggiunta di etanolo (20% v/v sull'acqua presente), ottenendo un molle di 29 Kg con un residuo secco di 9,4 Kg.

3) Depurazione

Il concentrato idroetanologico al 20% v/v è diluito con etanolo 95% v/v in modo da ottenere una soluzione idroalcolica al 50% v/v in etanolo (% riferita all'acqua presente).

La miscela diluita viene mantenuta sotto agitazione a $+45^{\circ}\text{C}$ per circa un'ora, poi lasciata decantare a temperatura ambiente e infine filtrata.

I fondi di filtrazione sono ripresi in acqua e omogenati a $+45^{\circ}\text{C}$, diluiti con etanolo sino al grado alcolico del 60% v/v e lasciati decantare per una notte a temperatura ambiente. La soluzione idroalcolica viene successivamente filtrata.

Si riuniscono le soluzioni idroalcoliche e si concentrano sotto vuoto alla temperatura di $+45^{\circ}\text{C}$ sino all'ottenimento di un concentrato denso acquoso. Mantenendo a $+45^{\circ}\text{C}$ e sotto agitazione, si aggiunge etanolo 95% v/v sino ad omogeneità e comunque sino al raggiungimento di un grado alcolico finale non inferiore a 20% v/v.

Il processo ha consentito di recuperare 6,29 g di Vanillina per kg di droga lavorata, corrispondenti al 93,7% della Vanillina totale stimata nella droga (6,72 g per kg di droga, sommando la Vanillina libera e la Vanillina legata nel glucoside).

ESEMPIO 2 (ESEMPIO COMPARATIVO METODO EP 0 555 466)

1) Trasformazione enzimatica

Le bacche verdi (220 Kg, con titoli 1,24% p/p in Vanillina Glucoside e

0,10% p/p in Vanillina) sono passate in tritacarne con griglia da 4,5 mm.

In percolatore da 1000 litri è preparato un volume d'acqua (espresso in litri) pari a due volte il peso (espresso in Kg) della droga macinata (ovvero 440 litri), contenente l'enzima Cellulosin AC40 in quantità pari allo 0,2% p/p rispetto alla droga.

La droga macinata è caricata in percolatore dotato di sistema di ricircolo.

La biotrasformazione è condotta a +40°C per 24 ore.

2) Estrazione

La miscela di reazione è percolata ed il percolato (506 Kg) è addizionato di 500 litri di etanolo 95% v/v per ottenere una soluzione al 50% v/v in etanolo.

L'esaurimento della droga è condotto in continuo con etanolo 50% v/v a +70°C, ottenendo quattro frazioni idroetanoliche da 200 litri ciascuna ed uno sgocciolato di pari volume (1000 litri in totale).

I due percolati (acquoso ed idroetanologico) sono mantenuti separati e concentrati ad una temperatura di ca. 30°C sottovuoto. Al termine a ciascun concentrato è addizionato etanolo per raggiungere un grado alcolico del 20% v/v sull'acqua presente.

Sono stati ottenuti i seguenti concentrati:

1. Concentrato idroetanologico da estrazioni acquose (37,4 Kg con un residuo secco di 10 Kg);
2. Concentrato idroetanologico da estrazioni idroetanoliche (30,6 Kg con un residuo secco di 3,5 Kg).

Il processo ha consentito di recuperare 4,29 g di Vanillina per kg di droga lavorata, corrispondenti al 61,3% della Vanillina totale stimata nella droga (7,00 g per kg di droga, sommando la Vanillina libera e la Vanillina legata nel glucoside).

RIVENDICAZIONI

1. Un procedimento per la preparazione di un estratto di vaniglia che comprende le seguenti fasi:
 - a) imbrunimento delle bacche;
 - b) estrazione delle bacche verdi seguita da trattamento con sistema enzimatico ad attività cellulasica e emicellulasica;
 - c) purificazione dei prodotti fino ad un concentrato arricchito in vanillina.
2. Un procedimento secondo la rivendicazione 1 in cui l'imbrunimento delle bacche avviene attraverso un ciclo di congelamento a temperatura compresa tra -10 e -30°C e scongelamento a temperatura compresa tra 2 e 8°C.
3. Un procedimento secondo la rivendicazione 1 in cui l'estrazione è effettuata con soluzioni idroetanoliche di concentrazione variabile da 20 a 80% v/v, a temperature comprese tra 40°C e 80°C.
4. Un procedimento secondo la rivendicazione 3 in cui l'estrazione è effettuata con soluzioni idroetanoliche di concentrazione variabile da 40 e 60% v/v, a temperature comprese tra 60°C e 70°C.
5. Un procedimento secondo una delle rivendicazioni da 1 a 4, in cui il trattamento enzimatico viene effettuato ponendo a contatto l'estratto con enzimi ad attività cellulasica compresa tra 2000 e 6000 UI/g.
6. Un procedimento secondo la rivendicazione 5, in cui si utilizza un enzima con attività compresa tra 3000 e 5000 UI/g.
7. Un procedimento secondo la rivendicazione 6, in cui si utilizza un enzima con attività di attività cellulasica pari a 4000 UI/g.
8. Un procedimento secondo una delle rivendicazioni da 5 a 7 in



l'enzima è impiegato in concentrazioni nell'intervallo di 0,05 - 0,4% sulla bacca fresca.

9. Un procedimento secondo una delle rivendicazioni da 5 a 8 in cui la reazione è condotta a temperature comprese tra 25°C e 45°C, per un tempo compreso tra 20 e 72 ore.

10. Un procedimento secondo una qualunque delle rivendicazioni precedenti in cui la purificazione (fase b) comprende una serie di trattamenti con soluzioni idroetanoliche a diverso grado alcolico per la depurazione del molle acquoso o di una soluzione idroalcolica al 50% v/v in etanolo ottenuta per diluizione con etanolo dell'estratto trattato enzimaticamente, operando a temperature comprese tra 40°C e 50°C.

Milano, 15 aprile 2003

Il Mandatario
(Bracco Mauro)
di Bianchetti Bracco Minoja S.r.l.

